

ORSAY
Série A
N° d'Ordre : 1339

PARIJS

LE FUCOIDANE SULFURYLE DE PELVETIA CANALICULATA
(Dcne & Thur.)

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE D'UN FACTEUR D'ADAPTATION
ECOLOGIQUE

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles
enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro A.O.97.32

de LESTANG Geneviève

Soutenue le 18 juin 1974 à la FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY
devant le jury :

MM. Président : A. MOYSE

Examineurs : J. FELDMANN,
DMW ANDERSON
M. QUILLET



**Comportement du fucoïdane sulfurylé
de *Pelvetia canaliculata* (Dcne & Thur.)
vis à vis des cations de la mer :
propriétés d'échange, renouvellement
des radicaux sulfuriques,
coenzyme d'activation des sulfates.
Intérêt fonctionnel**

GENEVÈVE DE LESTANG (1) et MARCEL QUILLET

Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Catholique de l'Ouest

B.P. 858, 49005 Angers Cedex

(Manuscrit reçu le 25 janvier 1974)

RÉSUMÉ

Le Fucoïdane Sulfurylé, qui est particulièrement abondant chez *Pelvetia canaliculata*, est doué de propriétés d'échange exceptionnelles. Il a une affinité marquée pour Mg qu'il fixe en quantité supérieure aux autres cations dissous, pendant son immersion en eau de mer. En solution artificielle contenant des quantités équivalentes de Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ et Na^+ , le Na et le K sont fixés d'abord mais ils sont presque aussitôt remplacés par le Mg et en quantité moindre par le Ca. Un problème particulier est posé car il apparaît qu'un atome de Mg remplace un atome de Na. Une hypothèse justificatrice est proposée, qui explique aussi le comportement du fucoïdane vis à vis de l'eau.

A ce pouvoir d'échange se superpose, dans les algues entières, vivantes et immergées, un mécanisme enzymatique dépendant de la respiration qui permettrait à l'algue de rejeter constamment les sulfates entraînant Na^+ et de fixer au même rythme des ions SO_4^{2-} vierges sur la chaîne polysaccharidique. Une étude cinétique de ce renouvellement est présentée : en 1 heure, 15 % des esters sulfuriques sont ainsi régénérés.

Un coenzyme activateur de SO_4^{2-} , indispensable pour produire ces liaisons semi-ester très endergoniques, a été isolé et analysé : le CDPS (cytosine-ribose-diphospho-sulfate) auquel le Mn paraît constamment associé.

Le rôle protecteur du fucoïdane sulfurylé contre l'excès de NaCl est ainsi mis en évidence.

(1) Ce mémoire constitue l'article principal d'une thèse de Doctorat d'Etat (Sci. Nat.) enregistrée au C.N.R.S. sous le n° A.O. 97.32.

SUMMARY

Sulphated Fucoidan (F.S.), which is specially abundant in Pelvetia canaliculata, is gifted of exceptional ion-exchange properties. It exhibits a marked affinity for Mg, which it fixes in larger amounts than the other solved cations while immersed in sea-water. In an artificial solution containing equivalent amounts of Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ and Na^+ , Na and K are first to be fixed, but they are almost immediatly substituted by Mg and, in a smallest amount, by Ca. The ion-exchange properties of F.S. are studied and the constants of affinity evaluated. A special problem arises from the fact that one atom of Mg takes the place of one Na. A hypothesis is suggested, which explains too the behaviour of F.S. towards water.

When the living, whole seaweed is submerged, this exchange power is controlled by an enzymatic process depending on respiration, which enables the alga to ooze the sulfates probably saturated of Na^+ and to fix, at the same rate, renewed SO_4^{2-} on polysaccharide (F.S.). A kinetic study of the renewal is presented: 15 % per hour of the sulphuric ester is regenerated by this process.

An SO_4^{2-} activating coenzyme, needed to produce the highly endergonic semi-ester bonds, has been isolated and analyzed: the CDPS (cytosine-ribose-diphospho-sulphate), to which Mn seems always to be associated.

From all this arises the evidence of the protective function of F.S. against NaCl.

INTRODUCTION

Les Algues brunes, qui forment le manteau végétal de la zone intercotidale de nos côtes rocheuses, sont adaptées à une alternance d'immersion et d'émersion qui leur fait subir successivement l'agression de la première et celle, plus grave encore, de la seconde.

Pendant l'immersion, parfois très courte, période d'activité photosynthétique et respiratoire maximale (BIDWELL et CRAIGIE, 1963), elles doivent accumuler les éléments indispensables parfois rares : K^+ , Ca^{++} , Mn^{++} , oxygène, iode, SO_4^{2-} , etc., écarter l'excès des ions les plus abondants : Na^+ et Cl^- notamment, dont le protoplasme vivant ne supporte que des quantités limitées, et résister enfin à la succion osmotique due à la forte salure, capable de les plasmolyser et de ralentir les échanges métaboliques.

En émersion, parfois prolongée, elles résistent à la dessiccation intense due au soleil et au vent, à laquelle s'ajoute la succion puissante produite par le film concentré de saumure adhérent au thalle.

Les mucilages acides qui entrent dans la constitution de leur paroi, généralement très abondants et que doivent traverser tous les éléments entrant ou sortant du protoplasme, sont en bonne part les agents responsables de la discrimination des ions, comme ils le sont de la lutte contre la dessiccation.

Chez les Fucacées, on trouve l'acide alginique et le fucoïdane sulfurylé (1)

(1) Le fucoïdane sulfurylé est le plus typique et, chez *Pelvetia*, de beaucoup le plus abondant des divers polysaccharides à base de fucose qui constituent la fucoïdine (de LESTANG et QUILLET, résultats encore non publiés).

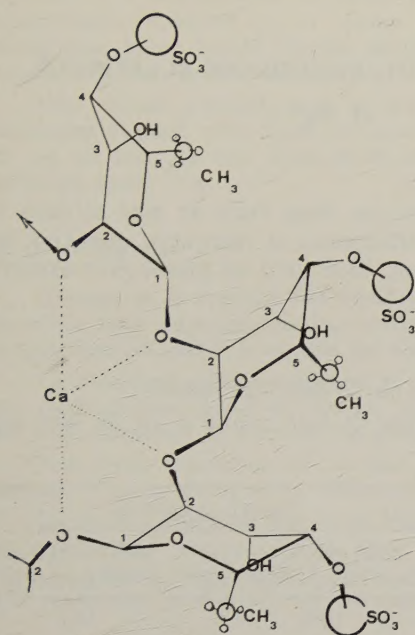


FIG. 1. — Fragment de chaîne du fucoïdane (demi-diagramme).

A cause des liaisons 1-2, les radicaux $-O-SO_3^-$ sont à l'extérieur des spirales et les oxygènes osidiques à l'intérieur.

toujours étroitement associés. Le premier ayant fait depuis longtemps l'objet de nombreuses études concernant son hydrophilie et son pouvoir d'échange (MONGAR et WASSERMANN, 1952; HAUG, 1959, etc.) il ne sera question ici que du fucoïdane, et même seulement du comportement du fucoïdane vis-à-vis des principaux cations marins (Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++}) puisque son comportement vis-à-vis de l'eau fera l'objet d'une autre publication (de LESTANG, 1974).

Le fucoïdane de *Pelvetia canaliculata* a été choisi parce qu'il est de beaucoup le plus abondant. Il forme environ 30 % de matière sèche des thalles. Les Fucacées possèdent proportionnellement d'autant plus de fucoïdane qu'elles colonisent un niveau plus élevé sur la côte, ou plus exactement qu'elles restent plus longtemps émergées (de LESTANG et QUILLET, 1972). *Pelvetia canaliculata* est l'une des plus caractéristiques puisqu'elle végète, sans paraître en souffrir, parfois 10 à 12 jours, sans recevoir autre chose que quelques embruns.

Pour l'objet précis de cet article, il nous suffira de rappeler que le fucoïdane sulfurylé de *Pelvetia* est un polysaccharide de masse moléculaire élevée constitué essentiellement d'unités fucose liés en 1-2 et porteurs (en 4) d'un radical sulfurique. Les $-O-SO_3^-$ sont donc tous pointés vers l'extérieur (fig. 1). Ils hérissent spirales et courbes de la chaîne glucidique.

La molécule entière est une molécule très ramifiée, grossièrement globulaire, capable de donner avec l'eau des solutions très peu visqueuses, mêmes sous la forme calcique et à des concentrations atteignant 15 à 20 %.

I. — AFFINITÉS DIFFÉRENTIELLES DU FUÇOÏDANE SULFURYLÉ POUR Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++}

Lorsqu'on compare la proportion des cations dans l'eau de mer et dans le fucoïdane purifié, on constate aussitôt des différences si marquées que l'on est tenté d'attribuer à ce dernier un rôle important, bien qu'il ne puisse être exclusif (tab. I) :

TABLEAU I

Proportions des cations dans l'eau de mer et dans le fucoïdane

Fucoïdane décationisé puis rééquilibré dans l'eau de mer comme il est dit plus loin (tableau II).

	eau de mer		fucoïdane sulfurylé	
	poids des cations (g) dans 100 g d'eau de mer	nombre d'atomes p. 100 cations	poids des cations (g) dans 100 g de fucoïdane	nombre d'atomes p. 100 cations fixés
Na^+	1,05	86,4	0,80	18,6
K^+	0,038	1,85	0,078	1,1
Ca^{++}	0,04	1,95	1,18	15,6
Mg^{++}	0,13	9,9	2,93	64,7

A. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. Préparation du fucoïdane.

a) Extraction.

Le principal obstacle à l'étude du fucoïdane est la difficulté que l'on a à l'extraire et à le séparer de l'algine et des protéines auxquelles il est étroitement associé. Notre technique a consisté à utiliser la propriété que possède le fucoïdane de rester soluble dans l'eau aussi bien sous sa forme acide que sous sa forme calcique, alors que l'algine est normalement insoluble sous ces deux formes et que les protéines le sont soit sous une forme, soit sous l'autre.

L'extraction se fait facilement dans l'eau froide ou chaude additionnée de 2 % d'acétate de calcium. La constitution du fucoïdane est respectée par ce milieu neutre mais la liaison solide qui lie la fucoïdine à certaines protéines n'est pas rompue et l'on obtient un produit brunâtre. La protéine, basique, ne représente pas plus de 6 % du poids de la fucoïdine extraite. Pour la détacher, il faudrait chauffer dans l'acide chlorhydrique 3 N pendant plusieurs minutes : traitement qui hydrolyse notablement la chaîne glucidique et que nous ne pouvions appliquer ici.

L'extraction par l'acide chlorhydrique à pH 2 n'entraîne comme impureté que les petites molécules d'algine. Elle donne un produit blanc, mais cette méthode a l'inconvénient

de modifier le fucoïdane en lui faisant perdre une partie de ses radicaux sulfuriques et en commençant l'hydrolyse de la chaîne. On réduisait cette attaque en opérant à basse température et en faisant flocculer aussitôt par affusion d'alcool absolu (2 volumes). La poudre recueillie, stockée au froid, se redissolvait très facilement dans l'eau.

Pour étudier l'affinité pour les différents cations, nous avons accepté ce fucoïdane légèrement dégradé, pour lequel changeait peu le rapport Mg/Na des cations qui se fixaient en eau de mer. Au bout d'une heure et demie d'équilibre, il donnait $Mg/Na = 3,2$ et le fucoïdane intact : 3,3.

b) Décationisation.

A cause de la structure très ramifiée et globulaire du fucoïdane, nous avons dû opérer en milieu aussi dilué que possible (concentration voisine de 0,1 %) : de façon à favoriser la dispersion des sites et la rapidité des échanges.

Le fucoïdane, déjà notablement décationisé par l'extraction acide, était traité à 0 °C par électrodialyse contre un courant d'eau distillée, dans l'appareil représenté figure 2, qui nous permettait de préparer les quantités suffisantes pour une série d'expériences.

Pour éviter l'autolyse des chaînes, la durée de cette électrodialyse ne devait pas dépasser 7 ou 8 heures et le voltage entre les électrodes : 30 Volts par centimètre.

La majeure partie du Na^+ et du Mg^{++} était éliminée en 4 ou 5 heures sous 15 V cm^{-1} , ou moins, mais non le calcium, dont il subsistait encore, pour 100 mg de fucoïdane, 20 à 30 μ moles, même après 3 heures supplémentaires dans un champ de 30 V cm^{-1} . On doit penser que ce Ca résistant est engagé dans un complexe hexacoordiné. Les oxygènes

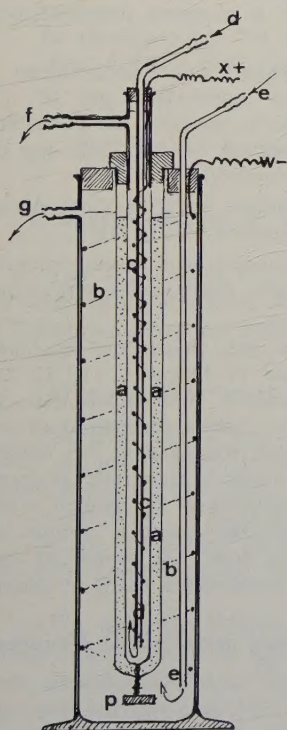


FIG. 2. — Electro-dialyseur.

Le fucoïdane à décationiser est maintenu en couche mince entre 2 sacs de dialyse.

Dans le sac intérieur (Union Carbide, 10 mm) plonge le tube d'arrivée d'eau sur lequel s'enroule l'électrode (+) « X ».

Le sac externe (Nojax, 45 mm) plonge dans une éprouvette de plastique où pénètre une arrivée d'eau « e » et une électrode (—) spiralee « W ». « f » et « g » : évacuation de l'eau.

Un poids « P » assure la verticalité des 2 sacs de dialyse. Distance entre les électrodes : 3,5 cm.

Débit de l'eau : 10 litres par heure autour de chaque électrode.

Différence de potentiel : de 30 à 100 volts.

Intensité du courant : décroissante de 50 à 7 mA.

L'ensemble est maintenu à 0 °C.

des ponts osidiques sont en effet tous disposés, à l'intérieur des spires du fucoïdane, à distance convenable de l'axe (voir fig. 1).

Le dosage exact de tous les cations était effectué avant chaque série d'expériences (cf. 1^{re} colonne des tableaux II, III et IV), ainsi que celui des radicaux sulfuriques.

2. Technique d'observation et d'évaluation des échanges.

Le fucoïdane, contrairement aux échangeurs d'ions habituellement étudiés, reste toujours très soluble dans l'eau. Il fallait donc un artifice pour séparer les éléments fixés des ions libres dissous.

On utilisait des membranes semi-perméables, au travers desquelles se faisaient très rapidement les échanges : Cellophane Spontex R.N.4 ou boyau Union Carbide de 10 mm ou boyau Nojax de 40 mm. Les pores les plus petits étant de $24 \text{ m}\mu$: 100 fois les dimensions de l'ion Mg hydraté, nous considérons qu'ils n'apportaient qu'une gêne négligeable à la circulation des ions volumineux par rapport aux autres (SCHMITT, 1961).

Plusieurs de ces membranes (boyaux Union Carbide et Nojax) laissaient diffuser dans l'eau, avant tout usage, des quantités notables de cations. Elles étaient lavées par un courant d'eau distillée jusqu'à ce que cette eau ne donne plus rien au Spectrophotomètre (24 heures environ).

Pour les études cinétiques, la couche de fucoïdane, régulière, très diluée, ne dépassait pas 3 ou 4 mm d'épaisseur.

Le sac héli-perméable contenant le fucoïdane décationisé était plongé dans un grand volume d'eau contenant un titre connu de chlorures. On le retirait au bout d'un temps donné, lavait rapidement l'extérieur par un jet d'eau distillée et le plongeait immédiatement dans de l'eau distillée fréquemment renouvelée.

Cette dernière dialyse a l'avantage d'annuler l'effet Donnan, mais l'inconvénient, si on la prolonge trop, de commencer à déplacer certains ions monovalents par H^+ . Au bout de 5 heures, toute trace de Cl^- avait disparu. Nous prolongions toutefois, par précaution probablement excessive, la dialyse pendant une dizaine d'heures, ce qui fait que la proportion des cations monovalents est peut-être légèrement sous-estimée.

Les cations étaient alors dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Varaf II (Jobin-Yvón) capable d'utiliser soit l'émission (Na^+ , K^+) soit l'absorption atomique (Ca^{++} , Mg^{++}).

Les valeurs obtenues ne peuvent avoir la prétention d'une rigueur parfaite étant donnée l'imprécision de la durée optimale de la dialyse finale. Elles sont intéressantes surtout par leur ordre de grandeur et par le sens de leurs variations.

Les radicaux sulfuriques étaient aussi dosés sur la solution après chacun des équilibres. Un échantillon séché était attaqué par l'acide nitrique pendant 12 heures à 110°C . Les sulfates étaient dosés sous forme de BaSO_4 par néphélométrie (photocolorimètre de Meunier), mais un problème particulier se posait parce qu'à ces faibles concentrations une fraction relativement non négligeable et variable du BaSO_4 restait soluble dans nos milieux complexes. Pour le dosage, on diluait donc la solution de façon à ce qu'elle renferme une quantité de SO_4^{2-} légèrement supérieure à la quantité solubilisée et on ajoutait à une prise de base x (5 ml contenant environ $300 \mu\text{g}$ de SO_4) soit des quantités connues de SO_4^{2-} (100 à $500 \mu\text{g}$) soit une seconde prise x de la solution à doser. On complétait avec de l'eau pour avoir le même volume partout, ajoutait de façon standardisée BaCl_2 et gomme arabique (1 volume à 10 %) et lisait l'absorption à 650 nm .

L'augmentation de densité optique correspondant à x surajouté permettait de déterminer, sur la droite étalon, la quantité de SO_4^{2-} contenue dans x (fig. 3).

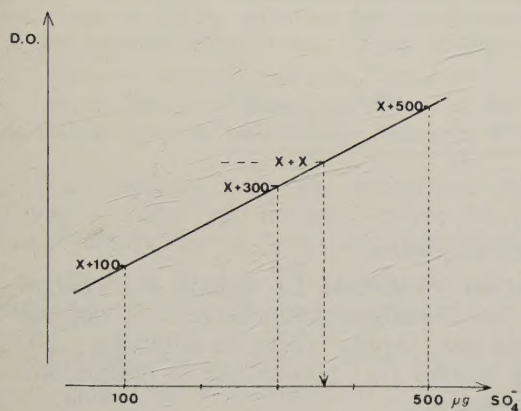


FIG. 3

FIG. 3. — Dosage néphélométrique des SO_4 .

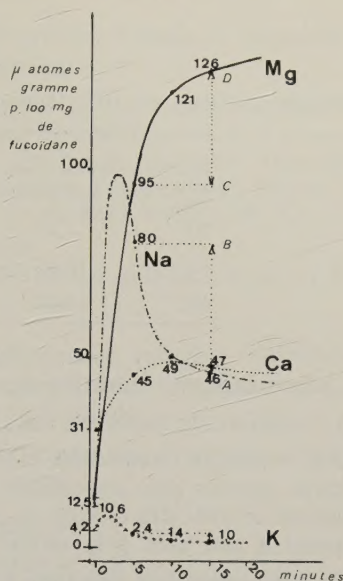


FIG. 4

FIG. 4. — Etablissement de l'équilibre des ions, en eau de mer, pendant les 15 premières minutes.

Le nombre d'ions Na^+ éliminés de la 5^e à la 15^e minute (distance A-B) est voisin du nombre d'ions Mg^{++} fixés durant la même période (distance C-D).

B. — RÉSULTATS ET DISCUSSION.

1. Echanges en eau de mer naturelle.

Les techniques expérimentales décrites plus haut, qui demandent de nombreuses manipulations dans des temps courts, sont en pratique assez délicates. Ci-dessous, deux des meilleures expériences :

Première expérience :

Fucoïdane purifié par HCl , décationisé par une électrodialyse brutale (60 Vcm^{-1}) lui ayant fait perdre 30 % de ses $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ (reste $230 \mu\text{eqv}^-$ pour 100 mg de fucoïdane) : 20 mg dans chaque sac de dialyse, en solution dans 80 ml d'eau distillée; pH 5,5.

A l'extérieur, 2 litres d'eau de mer naturelle diluée 35 fois. T ambiante.

En fin d'équilibre, élimination de l'eau de mer ayant pénétré dans les sacs : dialyse 22 heures contre de l'eau distillée renouvelée 5 fois (5 litres).

Un échange intense s'effectue durant la première demi-heure. Les cations monovalents, dont le taux maximum était atteint en moins de 5 min dans toutes nos expériences, sont rapidement déplacés par les cations divalents. L'échange se joue surtout entre Na^+ et Mg^{++} car il y a environ 50 fois plus d'ions Na^+ que d'ions K^+ dans l'eau de mer.

TABLEAU II
Equilibres en eau de mer

Résultats exprimés en 10^{-6} atomes-gramme pour 100 mg de fucoïdane décationisé

	0	15 min	30 min	10 h
Na ⁺	9,27	80	53	35
K ⁺	1,40	4	2,5	2
Ca ⁺⁺	10,66	25	28,5	29,5
Mg ⁺⁺	3,12	92	116	122

Le taux de Ca⁺⁺ varie à peine.

A l'équilibre, le fucoïdane est surtout magnésien.

Une remarque immédiate doit retenir l'attention. La somme des charges électriques portées par les cations en fin d'équilibre (340 charges +) dépasse notablement le total des charges (—) dues aux -O-SO₃⁻ (230); la différence : 110 correspond à peu près à la moitié des charges (+) portées par le magnésium.

Ce bilan cependant demande à être critiqué :

1°) Une partie de calcium ne doit probablement pas être comptée s'il est, comme nous le pensons, complexé sur les oxygènes placés à bonne distance dans les spirales des chaînes de fucose (cf. fig. 1) (1). Cette quantité est d'environ 20 à 30 μ -atomes-gramme pour 100 mg de fucoïdane; le surplus seulement serait fixé sur des -O-SO₃⁻ voisins.

2°) D'autre part, la dialyse prolongée pendant 15 heures après les 10 heures d'équilibrage a provoqué un léger échange de Na⁺ contre H⁺. La quantité de Na⁺ que nous dosons est donc un minimum.

En se mettant dans l'hypothèse la plus défavorable (aucune charge apportée par le calcium, et en ne comptant pas les charges H⁺) on trouverait encore :

$$35 + 2 + (122 \times 2) = 281 \text{ charges (+)}$$

c'est-à-dire un excès de 50 charges dont il faudrait rendre compte.

Ce phénomène n'est pas un accident car nous l'avons toujours observé, aussi bien dans les expériences faites en eau de mer que dans les expériences faites en milieu artificiel contenant des quantités électriquement équivalentes de cations.

Les nombres que nous avons trouvés montrent à l'évidence que de la 15^e à la 30^e minute, c'est-à-dire au moment où les propriétés d'échange s'exercent entre le sodium déjà fixé et le magnésium qui doit le remplacer, le nombre de cations divalents est sensiblement égal au nombre des cations monovalents, ce qui est fort étonnant :

$$\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 27 + 1,5 = 28,5 \text{ ions monovalents éliminés}$$

$$\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++} = 3,5 + 24 = 27,5 \text{ ions divalents fixés}$$

(1) Dans les gels d'alginate et de pectates, paraissent exister des complexes calciques analogues (REES, 1972) dans lesquels le Calcium est ainsi lié à 9 atomes d'oxygène.

Deuxième expérience : plus fine, destinée à préciser l'allure et l'intensité des échanges dans les premières minutes.

Fucoïdane purifié par addition de calcium, décationisé par des résines sulfoniques puis par électrodialyse (5 heures sous 15 Vcm^{-1} + 1 heure sous 30 Vcm^{-1}). Il a conservé la totalité des radicaux sulfuriques : $390 \mu\text{eqv}(-)$ pour 100 mg de fucoïdane. Dans chacun des 3 sacs de dialyse, maintenus préalablement vides pendant 1 heure dans 1 000 ml d'eau de mer naturelle diluée 35 fois, 15 mg, dissous dans 50 ml d'eau distillée; pH 5,5.

Agitation manuelle constante. Température ambiante.

En fin d'équilibre, élimination de l'eau de mer ayant pénétré dans les sacs par 17 heures de dialyse contre de l'eau distillée renouvelée 5 fois (5 litres).

En opérant avec une membrane particulièrement poreuse, équilibrée à l'avance contre l'eau de mer, l'entrée des ions est extrêmement rapide. Le taux maximum du Na^+ et du K^+ sont déjà dépassés à la 5^e minute.

Entre la 5^e et la 15^e minute, période où l'exercent les propriétés d'échange dans les conditions de notre expérimentation, on trouve :

pertes : $\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 34 + 1,4 = 35,4$ ions (+)

gains : $\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++} = 2 + 31 = 33$ ions (++)

2. Echange des cations en solution « équivalente ».

Pour cette série d'expériences, nous avons utilisé des sacs de dialyse contenant chacun 20 ml d'une solution à 150 mg par litre du polysaccharide décationisé.

Ils étaient plongés chacun dans 2 litres d'une solution de chlorure de concentration $c = 2.10^{-3}\text{M}$ en chacun des cations monovalents et $c = 1.10^{-3}\text{M}$ en chacun des cations divalents.

Ces concentrations ont été choisies pour éviter toute variation appréciable de volume dans les compartiments externes et internes.

Dialyse purificatrice contre l'eau distillée : 15 heures. T ambiante; pH initial : 5,5; pH final : 5,0.

Les résultats sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III
Equilibres en solution « équivalente »

Résultats exprimés en μ -équivalents pour 100 mg de fucoïdane décationisé

	0	5 min	20 min	30 min	60 min	2 h
Na^+	7,3	30,4	23,0	20,0	19,8	18,3
K^+	2,4	22,0	13,3	10,7	7,5	7,2
Ca^{++}	41,3	113,3	136,4	137,3	138,7	148,0
Mg^{++}	7,2	117,3	156,0	162,7	180,0	190,4

Dans ces échanges, on constate cette fois encore la fixation préférentielle du magnésium, bien que le calcium ait pris une importance beaucoup plus grande qu'en eau de mer.

Les cations monovalents ont à peine le temps de se fixer; ils sont très peu retenus.

En prolongeant très longtemps (18 heures) le contact entre le fucoïdane et les cations, afin d'être sûr de l'équilibre, on trouve des proportions peu différentes :

TABLEAU IV
Equilibre 18 h en solution « équivalente »

Pour 100 mg de fucoïdane, portant 253 $\mu\text{eqv } -\text{O-SO}_3^-$:

Na ⁺	9,3 μ -atomes-gramme soit	9,3 μ -eqv (+)
K ⁺	3,3 " "	3,3 "
Ca ⁺⁺	68 " "	136 "
Mg ⁺⁺	102 " "	204 "

Le Na⁺ et le K⁺ et peut-être un peu de Ca⁺⁺ ont continué à s'échanger contre du Mg⁺⁺.

Une partie de ces cations a d'ailleurs dû être déplacée par des ions H⁺ au cours de la dialyse finale contre l'eau distillée puisqu'on constate une légère acidification de la solution : pH 5,0 (40 $\mu\text{eqv H}^+$ dosés par acidimétrie).

Dans ce dernier équilibre, et il en est de même pour les résultats consignés dans le tableau III : il y a un excès de 100 charges (+), soit à peu près la moitié des charges apportées par Mg⁺⁺.

En admettant que 20 μmoles de Ca (40 charges +) soient complexés (cf. § 1 1^{re} expérience en eau de mer), les 40 H⁺ que nous avons dosés les compensent et la somme des charges (+) fixées est de 353.

3. Essai d'interprétation du comportement spécial du Mg⁺⁺.

Une certaine proportion du magnésium serait-elle chélatée par les nombreux atomes d'oxygène des ponts glucosidiques en donnant un complexe hexavalent ? A notre avis, ce ne pourrait être le cas que d'une fraction minime car la quasi-totalité du Mg est facilement éliminée par électrodialyse. Il serait d'ailleurs en compétition défavorable, pour les mêmes sites, avec le calcium dont la mobilité est plus grande et qui est capable de former des complexes plus stables.

L'explication la plus simple, puisque l'excès de charges que nous trouvons est toujours égal à la moitié des charges portées par Mg⁺⁺ et que l'ion Mg⁺⁺ semblait remplacer un seul Na⁺, serait que ce cation soit lié aux $-\text{O-SO}_3^-$ non par des liaisons ioniques mais par une liaison de coordination, dans un complexe comprenant aussi des molécules d'eau.

L'ion Mg⁺⁺ n'existe en effet dans l'eau que sous forme (Mg, 6 H₂O)⁺⁺ (BECK, 1970). Sa densité de charge exceptionnelle le rend de plus capable de donner avec les ions SO_4^{2-} un type de liaison mixte plus covalente que ionique (MICHEL et BENARD, 1964; GOUDOT et BERTRAND, 1968).

TABLEAU V
Densité de charge des cations (GOUDOT et BERTRAND, 1968)

	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
charge	+ 2	+ 2	+ 1	+ 1
rayon ionique	0,78	1,06	0,98	1,33
charge/r ²	3,3	1,8	1,0	0,56

Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que le radical $-O-SO_3^-$ prenne la place d'une des 6 molécules d'eau coordonnées.

La charge (+) résiduelle se répartirait sur les 5 molécules d'eau qui restent puis, de proche en proche, sur tout un essaim de molécules d'eau polarisées qui viendraient s'ordonner tout autour.

Cette hypothèse s'accorderait fort bien avec un certain nombre d'observations difficilement explicables autrement :

1°) Elle expliquerait la perte très rapide de l'eau de gonflement des films sous l'action d'un courant d'air sec : les liaisons hydrogène qui retiennent l'essaim de molécules d'eau sont évidemment fragiles.

2°) Elle expliquerait aussi l'avidité du fucoïdane pour la moindre humidité (vapeur ou embrun) mise à sa disposition puisque le léger déséquilibre électrique qui s'accroît lors de la dessiccation le rend de plus en plus apte à la capter.

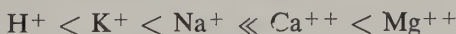
3°) La tendance à la covalence des ions Mg⁺⁺ explique aussi très bien la grandeur exceptionnelle de l'affinité du fucoïdane pour ce cation et le remplacement spectaculaire du Na⁺ par le Mg⁺⁺ (1).

Si l'on rejetait notre hypothèse comme trop hardie, on ne verrait pas comment pourraient s'établir des ponts Mg⁺⁺ suffisamment nombreux entre radicaux sulfuriques pointant dans toutes les directions et dont les sites sont généralement éloignés les uns des autres.

4. Calcul des différences d'affinité entre Na⁺, K⁺ et Mg⁺⁺.

Le fucoïdane sulfurylé fixe de façons très diverses les cations marins.

A concentrations équivalentes, les proportions retenues sont dans l'ordre :



(1) Un fucoïdane rendu artificiellement sodique, plongé pendant 8 heures dans une solution contenant des quantités équivalentes de Na⁺ et de Mg⁺⁺ puis dialysé contre de l'eau distillée constamment renouvelée pendant 24 heures, devient presque complètement magnésien :

Pour 100 mg de fucoïdane :

au départ : 200 μ mole de Na et 3 μ mole de Mg

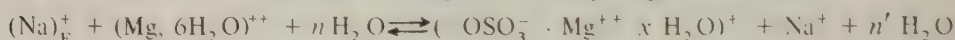
à la fin : 1,5 μ mole de Na et 133 μ mole de Mg

Ce bilan, pour être rigoureux, devrait évidemment tenir compte de la petite quantité de Na⁺ déplacée par H⁺ au cours de la dialyse finale.

La différence d'affinité entre 2 cations est mesurée par le logarithme de la constante de leur équilibre d'échange.

Elle se mesure habituellement entre les cations pris deux à deux et en l'absence de tout autre cation. Mais comme elle dépend largement du taux de pontage de l'échangeur (TRÉMILLON, 1965) et que le Ca^{++} peut modifier la structure spatiale du fucoïdane en créant des ponts ioniques stables entre $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ voisins, il nous fallait opérer sur un fucoïdane équilibré avec le calcium (2).

Pour l'échange $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Mg}^{++}$ qui est celui qui compte le plus dans la physiologie des algues, puisqu'il y a environ 50 fois plus de Na et de Mg que de Ca ou de K, le calcul donne, dans l'hypothèse acceptée précédemment :



A l'équilibre et pour des concentrations exprimées en équivalents :

$$k_{\text{Na} \rightarrow \text{Mg}} = \frac{[-\text{OSO}_3^- \cdot \text{Mg}^{++} \cdot x \text{H}_2\text{O}]_F^+ \cdot [\text{Na}]_e^+}{[\text{Na}]_F^+ \cdot [\text{Mg}, 6 \text{H}_2\text{O}]_e^{++}}$$

Dans le complexe $(-\text{O}-\text{SO}_3^- \cdot \text{Mg}^{++} \cdot x \text{H}_2\text{O})^+$, Mg est bien porteur de 2 charges (+) et il doit être compté comme tel dans le calcul de sa concentration dans le fucoïdane.

$[\text{Na}]_F^+$ est la concentration de Na dans le fucoïdane

$[\text{Na}]_e^+$ et $[\text{Mg}, 6 \text{H}_2\text{O}]_e^{++}$ sont les concentrations de ces ions dans l'eau de mer ou dans la solution « équivalente ».

En ne tenant pas compte, dans une première approximation, de la petite quantité de cations monovalents déplacés par H^+ , on trouve :

en eau de mer : $k_{\text{Na} \rightarrow \text{Mg}} = 30$

dans la solution « équivalente » : $k_{\text{Na} \rightarrow \text{Mg}} = 22$.

les valeurs de Na et de Mg dans le fucoïdane étant celles du tableau II dans le 1^{er} cas, et celles du tableau IV dans le second;

les concentrations dans l'eau de mer :

$$[\text{Na}]_e^+ = 456 \cdot 10^{-3} \text{ eqv par kg (1)}$$

$$[\text{Mg}]_e^{++} = 104,6 \cdot 10^{-3} \text{ eqv par kg}$$

Cette diminution de la valeur de « k » dans la solution « équivalente » s'explique par la proportion accrue du Ca par rapport aux autres cations :

dans l'eau de mer : 3,5 eqv. Ca^{++} pour 100 eqv. présents

dans la solution artificielle : 25 eqv. Ca^{++} pour 100 eqv. présents.

Des ponts plus nombreux ont pu se former entre les quelques $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ suffisamment rapprochés, empêchant la pénétration de l'ion $(\text{Mg}, 6 \text{H}_2\text{O})^{++}$, volumineux.

Cette augmentation de la constante d'équilibre en eau de mer présente l'intérêt de montrer que la rétention de Mg^{++} et par suite de l'eau qui lui est liée, sont exaltées en milieu marin.

(2) En eau de mer, où il y a très peu de Ca, il est presque entièrement complexé sur la chaîne glucidique. Nous avons négligé son échange avec les autres cations, qui doit être très faible.

(1) La concentration des sels dans les eaux de mer s'exprime en grammes par kg (IVANOFF, 1972).

Pour l'équilibre Na^+ et K^+ un calcul analogue donne :

En eau de mer (cf. tab. II) : $k_{\text{K} \rightarrow \text{Na}} = 0,37$.

En solution « équivalente » (cf. tab. IV) : $k_{\text{K} \rightarrow \text{Na}} = 2,8$.

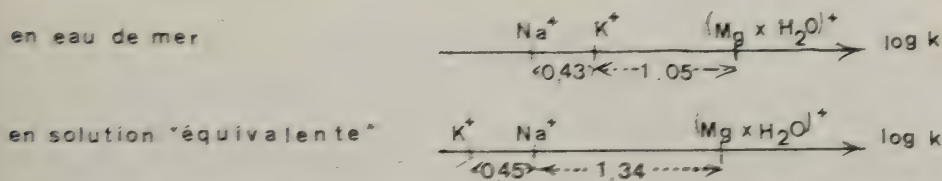
La différence d'affinité entre Na^+ et K^+ , égale au log. de leur constante d'équilibre, est positive dans un cas, négative dans l'autre :

en eau de mer : $\log k_{\text{K} \rightarrow \text{Na}} = 1,57 = -0,43$

en solution « équivalente » : $\log k_{\text{K} \rightarrow \text{Na}} = +0,45$.

Cette inversion de l'ordre des affinités a été observée dans toutes nos expériences, quelle qu'ait été la durée de la dialyse finale. Elle n'est pas surprenante puisqu'on rencontre un phénomène analogue sur les résines sulfoniques. Elle doit être due, plus qu'au changement de structure du fucoidane en présence d'un excès de Ca^{++} , à la variation des coefficients d'activité des ions K^+ et Na^+ sous l'effet des différences de concentrations en Ca^{++} et en Mg^{++} .

Les propriétés d'échange peuvent être résumées par les échelles d'affinité suivantes :



Bien que l'affinité du fucoidane pour K^+ soit supérieure, en eau de mer, à celle qu'il manifeste pour Na^+ , il faut bien remarquer qu'il reste à l'équilibre 17 fois plus de Na^+ que de K^+ . Cette prépondérance est due à ce qu'il y avait 46 fois plus de Na^+ que de K^+ dans le milieu (456 atomes-gramme de Na pour 9,7 de K dans 1 kg d'eau de mer).

Dès les premiers instants de l'immersion du fucoidane acide, c'est une véritable invasion de Na^+ que l'on observe, et quantitativement c'est bien du sodium beaucoup plus que du potassium qui s'échange dans les minutes qui suivent contre le magnésium (cf. fig. 4).

A la fin de cette étude de l'affinité, il faut s'étonner de voir qu'à concentrations égales (en équivalents) ce sont les ions les plus volumineux qui sont retenus de préférence aux autres : $\text{Mg} > \text{Ca} > \text{Na}$. Ceci semble indiquer que le système fucoidane + cation est plus stable à l'état dilaté qu'à l'état rassemblé.

Le système fucoidane salifié + eau est également plus stable à l'état gonflé qu'à l'état déshydraté puisque le fucoidane se gonfle indéfiniment, jusqu'à la liquéfaction, dans une atmosphère suffisamment riche en vapeur d'eau (de LESTANG, 1974).

Cette propriété différencie nettement le fucoidane sulfurylé de *Pelvetia* des polysaccharides sulfurylés des Algues rouges du type carraghenanes par exemple. Chez eux, l'équilibre des gels tend vers l'état le plus compact : le réseau en se resserrant chasse lentement l'eau qui remplit ses mailles : c'est le phénomène de la synerèse. Ici, le fucoidane a tendance à attirer le Mg^{++} et à s'enfler de son eau de solvatation et de l'important cortège de molécules d'eau qui s'ordonne

autour d'elle par suite du déséquilibre électrique produit par l'association semi-covalente du $-O-SO_3^-$ et de son cation.

Ainsi peut s'expliquer, du moins en partie, la remarquable hydrophilie du fucoïdane.

II. — RENOUVELLEMENT DES RADICAUX SULFURIQUES DU FUCOÏDANE

L'hydrophilie n'est pas la seule conséquence des propriétés d'échange du fucoïdane.

S'y rattache aussi assez étroitement le mécanisme de la défense de l'organisme vivant contre l'excès de chlorure de sodium dont les protoplasmes ne supportent qu'une proportion modérée.

Le fucoïdane sulfurylé se trouve dans toutes les Algues brunes et d'autant plus qu'elles sont exposées à des agressions plus sévères (LESTANG *et al.*, 1972). Le film d'eau de mer qu'elles retiennent en émergeant se concentre beaucoup, en effet, sous l'action du vent et du soleil.

La répulsion des ions Cl^- par la paroi mucilagineuse acide, chargée de même signe, se conçoit aisément. Le rejet du Na^+ est beaucoup moins évident.

Les propriétés d'échange du fucoïdane expliqueraient, certes, un pouvoir d'arrêt et même un certain rejet du Na^+ , mais ce mécanisme s'arrêterait au bout de quelques dizaines de minutes, lorsque la compétition entre Mg et Na aurait atteint son équilibre.

L'échange passif que nous avons décrit précédemment ne peut pas rendre compte d'une activité dont l'efficacité doit être maintenue constamment.

Mais les travaux de BIDWELL et GHOSH (1963) peuvent précisément suggérer que les sulfates du fucoïdane sont mobiles et se renouvellent constamment. Si du sulfate quitte la chaîne, en entraînant évidemment le cation attaché, tandis que de l'acide sulfurique neuf se fixe au même rythme, le polysaccharide se trouve constamment en état de fonctionner. Le renouvellement des sulfates ferait comprendre une élimination constante du sodium.

Les travaux de BIDWELL et GHOSH ont été effectués sur des coupes de *Fucus vesiculosus* immergées dans de l'eau de mer fortement enrichie en $^{35}SO_4$ (dans 4 ml, 95.10^{-6} moles de $^{35}SO_4$ ajoutées : ce qui double la concentration des sulfates). Ils constatent une incorporation rapide de $^{35}SO_4$ sous forme organique et ils vérifient que la très grande partie de ces sulfates se retrouve sur le fucoïdane.

Cette vitesse, très rapide pendant les premières minutes, décroît ensuite, mais elle se maintient longtemps. Pendant cette durée, la production de fucoïdane est mesurée en utilisant du $^{14}CO_4$. Elle est, au bout de 5 heures, 25 fois plus petite que celle qui correspondrait aux sulfates fixés; et encore 15 fois plus petite au bout de 24 heures. C'est pourquoi ils pensent qu'un certain « turn-over » des sulfates doit exister dans ces thalles. Mais ils ne prennent pas la peine de le vérifier et de le justifier autrement.

Le turn-over rigoureux est peut-être difficile à observer, mais un renouvellement des sulfates, c'est-à-dire une entrée et une sortie de SO_4 dans des temps successifs étaient à notre portée.

Une publication récente (EVANS *et al.*, 1973) confirme par des méthodes autoradiographiques l'incorporation rapide du $^{35}\text{SO}_4$ par la fucoïdine de *Pelvetia*. L'interprétation trop exclusive du phénomène fait écarter l'hypothèse de BIDWELL et GHOSH (1963) pour la raison que la sulfurylation se fait dans les vésicules de Golgi, c'est-à-dire dans le protoplasme.

Or il est visible, sur les photographies que le marquage est déjà très intense au bout de 2 heures d'incubation dans une eau de mer enrichie en $^{35}\text{SO}_4$. Les grains d'argent se voient en grand nombre au voisinage des cellules épidermiques et corticales. Ce n'est qu'au bout de plusieurs heures (4 à 90 h) qu'EVANS *et al.* observent des éléments marqués au voisinage des noyaux, dans les vésicules de Golgi.

Si, comme on semble l'avancer pour écarter l'hypothèse d'un renouvellement des sulfates sur la fucoïdine en place, on prétend que le marquage se fait exclusivement dans les vésicules de Golgi, il faudrait expliquer comment :

1) sur les autoradiogrammes, les grains d'argent très abondants apparaissent d'abord dans les zones entourant les cellules épidermiques et corticales;

2) comment concilier une vitesse de marquage par $^{35}\text{SO}_4$ 25 fois plus rapide que la production des glucides qui doivent le porter (BIDWELL et GHOSH, 1963);

3) comment rendre compte d'une excrétion de SO_4 dans l'eau de mer atteignant le trentième de la réserve totale des $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ en 30 minutes et seulement à partir de thalles vivants, comme nous allons le démontrer dans cette étude.

Il est probable que le phénomène de la sulfatation est plus complexe :

— que le fucoïdane produit *de novo* dans le noyau, à vitesse modérée, est bien sulfaté dans les vésicules golgiennes;

— mais que celui qui est déjà en place, à l'extérieur des cellules, bien plus abondant, est capable de perdre certains de ses $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ et d'en recouvrer d'autres très rapidement, grâce à un système enzymatique situé dans les parois (LESTANG et QUILLET, 1973 *a* et *b*).

A. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Il s'agissait pour nous de démontrer que des thalles entiers vivants rejettent bien dans la mer des quantités notables de sulfates; ensuite, de vérifier si les mêmes thalles absorbaient à la même vitesse les ions SO_4^{2-} de la mer, de telle façon que le nombre des radicaux entrant et sortant soit statistiquement comparable, puisque pendant une durée courte (1 h ou 2) où la croissance est insaisissable, le poids de sulfates par rapport au poids sec reste constant.

Pour ce faire, il fallait disposer de nombreux lots, aussi comparables que possible, d'algues vivantes. Le poids devait être suffisant pour donner des résultats statistiquement valables, mais pas trop grand, afin de pouvoir être traité avec rapidité. Les lots étaient en fait de 100 grammes frais (25 touffes de 5 à 10 brins), pesés après lavage à l'eau de mer, essorage 1 min à $300 \times g$ et essuyage soigneux.

On préparait chaque fois des lots témoins identiques mais tués par immersion dans de l'alcool bouillant (20 secondes) ou par l'eau bouillante, ainsi que nous l'expliquerons plus loin.

Dans d'autre cas, on bloquait seulement la respiration par KCN (1 % ou moins).

Ces témoins permettaient de distinguer les phénomènes de diffusion passive, assez peu importants d'ailleurs, des phénomènes physiologiques sous la dépendance d'enzymes.

1. Excrétion.

Pour observer le phénomène, on s'adressait à des algues ayant séjourné normalement, pendant plusieurs marées, dans la mer.

Les lots, traités comme nous l'avons dit, étaient plongés dans des bains successifs de 500 ml, exempts de sulfates.

Pour certaines expériences, on utilisait une eau de mer artificielle, dans laquelle les sulfates étaient remplacés par des quantités équivalentes de chlorures pour respecter la teneur habituelle en cations. On mettait, pour un litre :

NaCl (27,3 g) + MgCl_2 (5,0 g) + CaCl_2 (1,06 g) + KCl (0,6 g) + CaCO_3 (0,1 g).

Dans d'autres, on utilisait de l'eau de mer naturelle dont on avait précipité la presque totalité des sulfates par de l'acétate de baryum. Le reliquat des sulfates était dosé.

Au bout de 10 minutes, les algues étaient sorties de leur bain, essorées et plongées dans 500 ml d'un bain neuf d'eau de mer désulfatée identique au précédent.

Après 10 nouvelles minutes, un troisième et un quatrième bain de même durée étaient effectués dans les mêmes conditions.

Les sulfates de chaque bain étaient précipités à l'ébullition en milieu acide à l'état de sulfate de baryum. Ce précipité était abondamment lavé et mis à digérer en tube scellé dans de l'acide nitrique pur 12 heures à 105 °C.

Ces sulfates étaient évalués soit par pesée lorsqu'ils étaient abondants (1^{er} bain) soit par néphélométrie par la méthode précédemment indiquée (fig. 3) lorsqu'ils étaient en quantité réduite.

Les membranes des lots témoins étant devenues plus perméables laissaient échapper en outre des nucléotides phosphatés qui obligeaient à une purification supplémentaire par fusion alcaline, dont le détail assez complexe sera indiqué dans la partie III.

2. Absorption.

L'absorption des sulfates était évaluée par la différence entre la quantité de sulfates contenue dans l'eau de mer naturelle et celle qui résultait de l'immersion des thalles de *Pelvetia* que nous avions partiellement carencés au préalable.

Les lots d'algues étaient pour ce faire plongés pendant 30 minutes dans une eau de mer désulfatée. Les expériences précédentes nous avaient montré que le taux interne des sulfates était diminué de 5 % environ. Cette diminution était suffisamment faible pour ne pas troubler d'une façon notable les mécanismes métaboliques.

Comme dans les expériences précédentes, les touffes de *Pelvetia* étaient laissées 10 min dans le 1^{er} bain de 500 ml, essorées pendant 1 min à 300 × g et immédiatement plongées dans un 2^e puis un 3^e bain de 500 ml d'eau de mer.

Les volumes étaient soigneusement relevés. Des écarts faibles (≤ 5 ml) dus à l'évaporation, aux manipulations expérimentales ou à une absorption étaient parfois observés. Mais même dans les cas où de l'eau de mer aurait pu entrer, la quantité de sulfates introduite aurait été bien trop faible (10 mg au maximum) pour modifier substantiellement nos conclusions.

Nous avons essayé différents moyens de bloquer les enzymes qui pouvaient intervenir. Le plus intéressant a paru être l'addition de KCN (de 1 p. 1 000 à 1 p. 100) dans le 1^{er} bain d'absorption. La respiration étant bloquée, on constate que l'absorption l'est aussi, ce qui manifeste l'étroite relation entre la production d'énergie et le phénomène métabolique complexe : soit l'introduction de SO_4^{2-} dans le milieu intérieur, soit la fixation sur les chaînes de polyfucosane, soit les deux.

B. — RÉSULTATS.

1. Excrétion.

Dans les nombreuses expériences que nous avons faites, tant avec de l'eau de mer artificielle sans sulfates qu'avec de l'eau de mer désulfatée, les algues nous ont toujours livré une quantité importante de SO_4 : de l'ordre de 100 mg (pour 100 g de *Pelvetia*) durant la première demi-heure, alors que les thalles n'en contenaient au départ que 2,5 g environ, et sous forme d'ester.

Le tableau VI donne quelques résultats obtenus à partir d'algues fraîchement retirées de la mer.

TABLEAU VI

Milligrammes de SO_4 excrétés par 100 g frais de *Pelvetia canaliculata* plongés dans des bains successifs de 500 ml d'eau de mer désulfatée

	1 ^{ère} exp.	2 ^{ème} exp.	Témoin bouilli
1 ^{er} bain : 10 min d'immersion	60	59	traces
2 ^{ème} bain : 10 min d'immersion	21	20	0
3 ^{ème} bain : 10 min d'immersion	14	9	0
Total	95	88	traces

Il faut noter la rapide décroissance de la vitesse de cette excrétion avec le numéro d'ordre des bains. Nous en proposerons l'explication plus loin.

Au contraire des thalles vivants, cette excrétion est pratiquement nulle chez les témoins tués. Il ne s'agit donc pas d'une diffusion passive.

Ce résultat avait d'abord été obtenu en tuant les algues par une immersion de 20 secondes dans de l'alcool absolu bouillant. Le 1^{er} bain d'eau de mer sans sulfate ne contenait, au bout des 10 min., que 2 mg de SO_4 , le 2^e et le 3^e : rien

Mais on pouvait objecter que les pores des thalles s'étaient resserrés dans l'alcool.

Dans nos expériences définitives, nous avons donc tué les algues en les projetant dans le premier bain d'immersion, bouillant, titré en SO_4 . Au bout de 3 minutes, ce bain était énergiquement refroidi et on laissait diffuser les algues mortes, devenues vertes et très molles (10 min d'immersion en tout).

Par cette méthode, on ne trouve dans le 1^{er} bain que des traces de SO_4 libérés.

Ce dosage de sulfates exige une technique particulière, car 150 mg de matières organiques ont diffusé et flocculent sous l'action du BaCl_2 , risquant d'adsorber l'éventuel BaSO_4 cherché. Leur solubilisation demandait des précautions car le manganèse présent donnait facilement des complexes très stables avec les sulfates et avec le phosphore. La technique qui nous a donné les résultats les plus sûrs est la suivante, inspirée de celle que l'on emploie pour doser P dans les aciers

(CHARLOT & BÉZIER, 1949) :

A) L'eau de mer de diffusion (500 ml contenant un reliquat de 48 mg de SO_4) est additionnée de BaCl_2 (10 ml à 10 %) en milieu chlorhydrique à pH 1. On recueille par centrifugation, lave le précipité à l'eau (50 ml, 2 fois) : $P = 276$ mg.

B) Le solide est épuisé par de l'acide trichloracétique à 10 % (10 ml) à 80 °C pendant une minute. Après centrifugation et lavage on recueille : 203 mg.

C) Le solide encore humide est oxydé par HNO_3 (6 N), 10 ml, à 100 °C pendant 15 min, puis additionné de KMnO_4 (0,15 ml à 2 %). Le manganèse sous la forme MnO_2 précipite à l'ébullition (15 min).

D) MnO_2 est dissous par 0,2 ml de bisulfite de soude à 36 °Bé, versés dans la liqueur précédente. On étend par 1 volume d'eau et continue l'ébullition pour éliminer l'excès de NO_3 , NO_2 , SO_2 .

Le résidu insoluble, encore légèrement brunâtre, est soumis à un deuxième traitement C et D. Il est ensuite abondamment lavé.

On recueille 124 mg de BaSO_4 , qui correspondent à 51 mg de SO_4 .

Or, 48 mg de SO_4 avaient été apportés par l'eau de mer désulfatée.

Il ne reste que 3 mg rejetés par les algues bouillies.

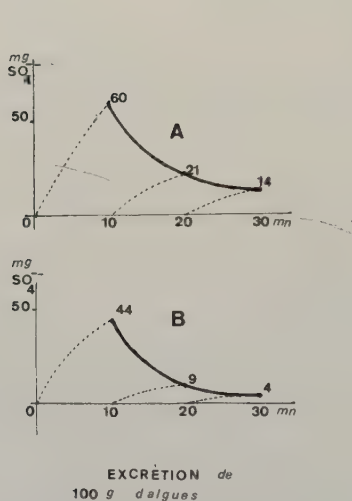


FIG. 5

FIG. 5. — Excrétion des sulfates par les thalles immergés.

10 minutes dans 500 ml d'eau de mer désulfatée (3 bains successifs).

A) Algues fraîchement exsiccées.

B) Algues exsiccées depuis 4 jours.

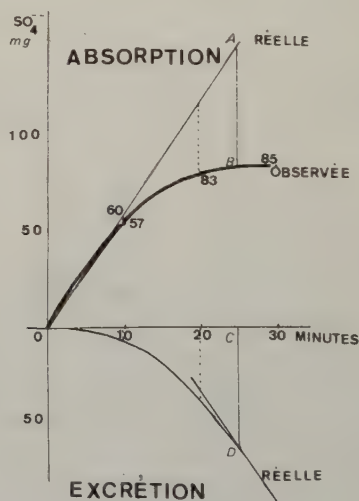


FIG. 6

FIG. 6. — Courbe cumulative de l'absorption des ions SO_4^{2-} par des thalles immergés (100 g de *Pelvetia canaliculata*).

La courbe de l'excrétion, construite à partir de la courbe d'absorption par des considérations théoriques, coïncide effectivement avec les résultats exprimés dans le tableau VI.

Ce résultat a été contrôlé par une troisième expérience, qui évitait toute altération de la structure des thalles. Un lot de 100 g d'algues, préparé et essuyé en même temps que les précédents, a été rapidement desséché dans un courant d'air sec à température ordinaire, puis maintenu pendant 2 mois à l'obscurité dans la même atmosphère sèche. Les algues étaient alors mortes. On les a mises à regonfler, sans les essuyer cette fois, dans de l'eau de mer artificielle sans sulfates (500 ml + 32 ml d'eau distillée de regonflement) et laissé diffuser à froid pendant 1 heure.

Le dosage de SO_4 a été effectué par la méthode ci-dessus; la seule différence est que, au départ, l'eau de mer ne contenait aucun sulfate.

Les algues ainsi tuées ont livré cette fois 3,5 mg de SO_4 .

Il faut donc en conclure qu'il n'y a pratiquement aucune excrétion à partir des algues mortes, les traces de sulfates dosées correspondant sans doute à ce qui demeurait dans les espaces libres.

Les expériences faites avec des algues émergées depuis plus ou moins longtemps et ayant subi les intempéries normales (alternance de soleil et de pluie) et qui n'ont pas pu se réalimenter en sulfates, perdent des quantités moindres de sulfates quand on les traite comme nous l'avons dit pour les algues fraîchement immergées.

Après une émergence de 4 jours, un lot de 100 g d'algues excréta (fig. 5)

$$44 + 9 + 4 = 57 \text{ mg de } \text{SO}_4$$

Il semble que l'on puisse en conclure que la quantité excrétée dépende de la réserve initiale en sulfates et qu'un minimum doit être maintenu dans les thalles.

2. Absorption.

Le tableau VII résume 2 expériences un peu différentes : pour l'une, les bains préparatoires dans de l'eau de mer naturelle partiellement désulfatée (restaient 48 mg de SO_4 dans les 500 ml) ont été au nombre de 4; pour l'autre, au nombre de 3 (tous de 10 min chacun), avec donc une privation un peu moindre.

TABLEAU VII
Milligrammes de SO_4 absorbés par 100 g frais de Pelvetia canaliculata

	1 ^{ère} exp.	2 ^{ème} exp.	Témoin (1 % de KCN)
Privation préliminaire : bains de 10 min dans 500 ml d'eau de mer désulfatée	4 bains	3 bains	3 bains
Absorption : bains de 500 ml d'eau de mer			
1 ^{er} bain : 10 min d'immersion	75	57	40
2 ^{ème} bain : 10 min d'immersion	38	26	0
3 ^{ème} bain : 10 min d'immersion		2	0
Total	113	85	40

On constate pour les thalles vivants une absorption très forte dans le premier bain et un ralentissement assez rapide dans les bains suivants. Cette absorption paraît s'arrêter au bout de 25 min (dans le 3^e bain).

Le témoin dont on bloque la respiration par affusion de 1 % de KCN dans le 1^{er} bain cesse d'absorber au bout de quelques minutes. On n'observe aucune absorption de sulfates dans les bains qui suivent.

La seule difficulté des dosages provenait de la faible diminution des SO_4 par rapport à la masse. Un soin très particulier de précision a été apporté à chacune des manipulations pour garantir une précision au moins du centième dans ces différents dosages.

C. — DISCUSSION.

Tous ces résultats paraissent s'accorder sans difficulté avec les premières observations de BIDWELL et GHOSH (1963). Mais ils demandent à être interprétés correctement.

Ils peuvent être représentés par des courbes figuratives dont ci-joint un exemple (fig. 6) :

La courbe cumulative de l'absorption monte rapidement pour atteindre un plafond vers la 25^e minute.

Une telle forme de courbe fait penser d'abord à un phénomène de saturation.

Saturation passive des espaces libres par l'afflux des ions sulfates libres ? L'hypothèse ne paraît guère admissible puisque des témoins privés d'énergie respiratoire cessent d'absorber au bout de quelques minutes (moins de 5 min). Si des sulfates s'étaient introduits d'une façon passive jusqu'à saturation, nous les aurions vu diffuser des algues tuées dans l'eau sans sulfates, bouillante; or nous avons vu qu'il n'en était rien.

L'expérience de BIDWELL et GHOSH (1963), nous apprend d'ailleurs que la pénétration des sulfates est presque immédiatement suivie de leur fixation sur la fucoïdine.

S'agirait-il d'une saturation de sites estérifiables par SO_4^{2-} ? L'hypothèse doit aussi être écartée car dans les expériences de BIDWELL précitées aucune carence préalable n'intervenait et cependant la fixation des sulfates était observée durant plus d'une heure : elle était environ 100 fois plus rapide que la synthèse de la chaîne glucidique. Sur quels sites se seraient fixés les radicaux $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ s'il ne s'était dégagé, en même temps, des sites pourvus ?

Faudrait-il admettre une adsorption par des forces faibles sur des structures de la fucoïdine, qui se satureraient progressivement ? On ne voit pas comment expliquer alors que cette absorption cesse en même temps que la respiration et qu'aucune désorption ne se produise dans l'eau désulfatée, malgré la grande perméabilité des membranes.

Nos courbes sont donc à interpréter, nous semble-t-il, non comme un phénomène de saturation, mais comme la traduction d'un équilibre dynamique entre les ions sulfuriques entrants fixés enzymatiquement, et les sulfates hydrolysés et excrétés dans la mer.

L'absorption est maximum au moment où l'algue carencée est plongée dans de l'eau riche en sulfates, alors que l'excrétion est à son minimum du fait de la privation initiale. Au bout de quelques minutes, elle doit être constante et représentée par une droite de pente constante égale à 60 mg par 10 min.

Au-delà de 25 min, la courbe horizontale exprime l'équilibre entre cette absorption constante et une excrétion qui a pu reprendre son rythme normal au bout de 25 min, représentée par conséquent par une droite de pente égale et opposée à celle de l'absorption. Elle passe par un point D tel que $AB = CD$. La courbe, qui part tangente à l'axe des y a, à chaque instant, une ordonnée égale à la différence des ordonnées entre la droite d'absorption et la courbe de l'absorption apparente. Cette courbe construite à priori correspond, aux erreurs d'expérience près, aux valeurs de l'excrétion trouvées (cf. tab. VI).

Une telle interprétation permet d'avoir une idée de la vitesse du renouvellement des sulfates. Entrée et sortie étant les mêmes, elle est voisine sans doute de la vitesse observée durant les 10 premières minutes, soit environ :

60 mg de SO_4 en 10 min

C'est une vitesse très rapide puisqu'elle représente au bout d'une heure environ 15 % de la quantité de sulfates fixée sur la fucoïdine.

Cette vitesse n'étonnera pas si l'on se rappelle que *Pelvetia* ne reste immergé que pendant 2 à 3 heures lors des marées les plus hautes, et ainsi que l'ont montré BIDWELL et CRAIGIE (1963), c'est presque exclusivement pendant ces moments là que l'algue synthétise ses polysaccharides et respire avec intensité.

La fixation de SO_4^{2-} sous une forme covalente ester d'une chaîne glucidique de fucoïdane demande certainement beaucoup d'énergie, que fournissent normalement la photosynthèse et la respiration.

D. — NATURE DU CATION EXCRÉTÉ.

Le rejet du sodium par les thalles serait, nous semble-t-il, suffisamment démontré si l'on constatait encore que les ions SO_4^{2-} sortent accompagnés de Na^+ .

Avec les moyens dont nous disposons, nous ne pouvions pas l'observer, car la quantité de Na^+ excrétée dans le 1^{er} bain (que l'on peut évaluer en tenant compte de la quantité de sulfates recueillie) serait au maximum de 28 à 29 mg. C'est très peu, en regard de la quantité de Na^+ contenue déjà dans les 500 ml d'eau de mer désulfatée : 5 440 mg de Na^+ .

L'accroissement de la quantité de Na^+ attendue se serait guère que de 5,3 p. 1 000.

Les dosages par émission de flamme, qui exigent des dilutions considérables, ne permettent pas une telle précision.

Mais comme il n'y a guère qu'une alternative : Na^+ ou Mg^{++} , il est beaucoup plus facile d'essayer de voir si c'est le magnésium qui est excrété.

Le magnésium est en effet en quantité bien moindre dans l'eau de mer. On pourrait avoir 15 mg en plus des 673 contenus dans les 500 ml du 1^{er} bain, soit une augmentation de 2,1 %. Cette différence pourrait être appréciée cette fois d'autant mieux que la précision des dosages de Mg, par absorption atomique, est supérieure à celle que l'on pouvait obtenir pour le sodium (émission de flamme). Nous avons vérifié qu'une différence de 1 % était parfaitement lisible et reproductible ; or, dans les 3 lots étudiés, nous n'avons constaté aucune excrétion.

Ce n'est donc pas le Mg^{++} qui accompagne principalement les SO_4^{2-} .

Ce ne pourrait être non plus le K^+ car il n'en pénètre que très peu dans les thalles plongés dans l'eau de mer, tandis que des quantités importantes de SO_4^{2-} sont rejetées.

On doit donc en conclure, avec une très grande probabilité, que c'est surtout le Na^+ qui est excrété avec les radicaux sulfurylés.

Ainsi se trouve étayée l'hypothèse que nous avaient suggéré les travaux de BIDWELL et GHOSH : intervention efficace de la fucoïdine dans la protection du protoplasme contre l'excès de NaCl de l'eau de mer.

III. — NUCLÉOTIDE ACTIVATEUR DE SULFATE : LA CYTIDINE-DIPHOSPHO-SULFATE (CDPS)

L'hypothèse précédente se trouve peut-être mieux étayée encore par la découverte du nucléotide activateur des sulfates dans la zone superficielle des thalles, vraisemblablement dans la paroi mucilagineuse elle-même. Il sort en effet en moins de 10 min à partir des thalles entiers nécrosés qui servaient de témoin dans les expériences d'excrétion des sulfates, alors que les courtes chaînes de fucoïdine commençaient à peine à diffuser.

Cet activateur était un des chaînons indispensables du mécanisme de fixation rapide des sulfates minéraux sur la chaîne du fucoïdane.

A. — EXTRACTION ET PURIFICATION.

Pour ne pas introduire d'erreur par la suite dans les dosages de sulfate du nucléotide, il fallait être assuré du fait que ce sulfate ne provenait pas du bain salé dans lequel on devait le recueillir. L'excrétion devait donc se faire uniquement dans de l'eau de mer sans sulfate aucun.

Il fallait aussi s'assurer que le sulfate que l'on allait doser ne provenait pas du contenu des espaces libres (à la vérité très faible) qui auraient pu retenir un peu de l'eau de mer dans laquelle l'algue avait vécu. Diverses techniques ont été essayées. La plus simple et la plus efficace était d'utiliser pour ces extractions de nucléotide, les algues mortes, séchées à l'air depuis 2 ou 3 mois, à la surface desquelles les sels, le mannitol, le volémitol, etc., avaient cristallisé en efflorescences microscopiques, qui avaient progressivement pompé par capillarité l'eau des espaces libres.

Une immersion de quelques secondes dans l'eau de mer sans sulfates, suivie d'un essorage et d'un essuyage soigneux, évitaient tout danger de doser autre chose que les sulfates organiques. L'extraction était conduite ensuite à basse température (4 °C), à partir de 60 g séchés à l'air (issus de 180 g frais), dans 1 500 ml d'eau de mer artificielle sans sulfates, pendant 12 heures.

Le bain de diffusion était concentré puis dialysé contre de l'eau distillée (5 à 6 heures).

Le dialysat contenait, en plus de la petite molécule de nucléotide, les plus petites molécules de fucoïdine, des phénols, des protéines et des sels.

La purification ultérieure a été obtenue par 2 méthodes qui donnent finalement les mêmes rapports molaires :

a) par floculation dans l'alcool à 70 °GL du dialysat concentré à basse température, on élimine encore les sels, la majeure partie des phénols, la fucoïdine, mais on laisse certaines protéines. On vérifie spécialement par hydrolyse d'une fraction et chromatographie sur papier qu'il n'y a plus trace de fucose.

Cette technique a l'avantage de peu dégrader le nucléotide et de respecter notamment la proportion des sulfates par rapport au phosphore. Mais pour caractériser par l'ultra-violet la nature de la base qui s'avère pyrimidique, une purification complémentaire a été utilisée : un séchage sous vide phosphorique et une reprise par l'eau qui laisse insoluble bon nombre d'impuretés (30 mg à partir de 54 mg sec) suivie d'un passage sur colonne de Bio-Gel P₂ : diamètre 1 cm, hauteur 44 cm, élution par l'eau; le nucléotide purifié sort à partir du 200^e ml. On en recueille 10 mg environ sur les 54 mg de floculat. Les impuretés phénoliques, qui étaient les plus gênantes, ne sont pratiquement pas retenues. Elles sont éliminées dans les 100 premiers ml d'eau.

b) Une autre technique, plus rapide, donnait un produit blanc : une floculation par le chlorure de baryum à pH 2,5. Les sels, la majeure partie des phénols et des substances protéiques, la fucoïdine, restent solubles.

Le nucléotide barytique obtenu ne se redissout malheureusement que très difficilement après séchage, même dans l'acide trichloracétique; il ne s'y dissout qu'à chaud et dans ces conditions la majeure partie du sulfate est hydrolysée.

B. — IDENTIFICATION DES COMPOSANTS.

1. La cytosine.

La base contenue dans la substance purifiée présentait une résistance à l'hydrolyse tout à fait exceptionnelle, qui écartait l'éventualité d'une base purique. L'hydrolyse n'était totale qu'au bout de 12 heures, en tube scellé, avec de l'acide chlorhydrique 6 N à 105 °C, ou mieux, avec de l'acide perchlorique 12 N (2 heures à 100 °C).

Le spectre ultra-violet (fig. 7) ne pouvait s'accorder qu'avec celui de la cytosine :

λ max	275 à pH 1
	282 à pH 14
λ min	250

Technique : 35 mg de nucléotide barytique ont été hydrolysés par 0,6 ml de HClO₄ 12 N (2 h à 100 °C), puis on a neutralisé par KOH, filtré sur un verre fritté pour éliminer le perchlorate de potasse et le sulfate de baryum qui s'était détaché, lavé ce précipité par HCl N/10 et fait bouillir le filtrat acide pour libérer les -NH₂ de la cytosine qui avaient réagi sur les produits de décomposition du ribose.

Evaporé à sec sous vide, l'hydrolysate est débarrassé de ces résidus et repris par HCl N/10 ou KOH N/10 pour les spectres.

On avait ainsi éliminé toute trace de furfural, dont le spectre interfère avec celui de la cytosine.

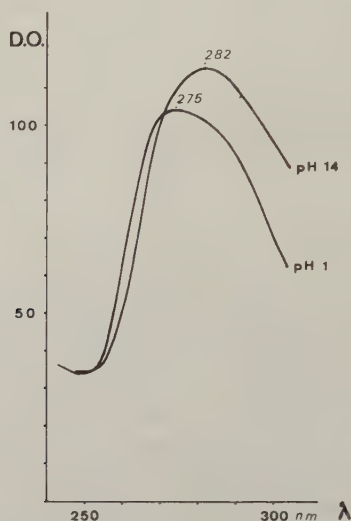


FIG. 7. — Spectre U.V. de la base du nucléotide.

Concentration divisée par 2 pour le spectre alcalin.

Ce spectre ne saurait être confondu avec celui des autres bases pyrimidiques et encore moins avec celui des bases puriques :

	λ max	
	pH 1	pH 14
Cytosine	276	282
Thymine	264,5	291
Uracile	259,5	284
Adénine	262	269
Guanine	275,5	273,5

2. Le ribose.

Le nucléotide contient une substance réductrice capable de donner du furfural et les réactions colorées des pentoses avec l'orcine et avec l'anthrone. Elle se révèle en rouge sur les chromatogrammes, avec la *p*-anisidine chlorhydrique. Il s'agit du ribose car la difficulté de l'hydrolyse acide écarte l'hypothèse du déoxyribose dont la libération est beaucoup plus rapide, même à partir de la cytosine : 40 min. dans HClO_4 7,5 N (MARSHAK et VOGEL, 1951).

Le dosage demande une modification préalable de la molécule car le pont N-C entre le N de la cytosine et le C_1 du ribose est stabilisé par le cycle de la base pyrimidique et la double liaison de l'atome d'oxygène qu'il porte en C_2 . La rupture du pont est facilitée par une bromuration (MASSART et HOSTE, 1947). Pour l'obtenir, nous avons dû modifier légèrement la technique classique, car notre stock de nucléotide était barytique, peu soluble. Un gonflement préalable dans la

potasse était nécessaire (15 mg dans 1 ml de KOH 2N, 1 h) suivi d'une neutralisation par HBr. Du brome (0,1 ml) est ensuite ajouté et on doit chauffer pendant 3 à 4 heures à 105 °C. L'excès de brome est éliminé par un courant d'azote. L'hydrolyse finale est faite par H₂SO₄ N, 1 heure à 105 °C. Pour le dosage, à l'anthrone (in WHISTLER et WOLFROM, 1962), on traitait en même temps un témoin ribose et comparait les maxima de densité optique à 625 nm.

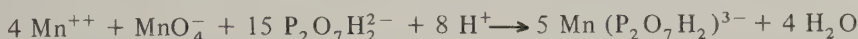
On trouve une proportion de 15 % en ribose dans la poudre barytique, au lieu de la quantité théorique (22 %) mais ceci est très normal car aucune technique ne permet d'obtenir un résultat parfait étant donné les conditions drastiques nécessaires.

3. Le phosphore.

Il apparaît de façon très irrégulière dans les hydrolysats acides et reste souvent masqué aux réactifs molybdiques classiques après les minéralisations que l'on effectue habituellement pour doser P dans les nucléotides cytidyliques (H₂SO₄ + HClO₄ + HNO₃) : cf. MONTREUIL, 1952.

Les fusions alcalines donnent des résultats assez variables, suivant les catalyseurs utilisés (KNO₃ notamment).

Ce comportement fort gênant est dû au manganèse qui reste dans nos produits purifiés et qui forme des complexes très stables avec les sulfates et avec les pyrophosphates lorsqu'il est à l'état Mn^{III} :



Pour empêcher la formation de ces complexes, nous nous sommes inspiré encore des méthodes utilisées pour doser P dans les aciers, et utilisé celle qui a été décrite précédemment (II, B, 1). Le principe est d'obtenir le manganèse entièrement à l'état Mn⁺⁺, tout en évitant la formation des pyrophosphates.

La méthode de Fiske et Subbarow (DELSAL *et al.*, 1955) est ensuite très normalement appliquée.

Nous avons trouvé ainsi 8,8 % en P dans notre nucléotide barytique et 9 % dans nos 3,75 mg de nucléotide élué du Bio-Gel; remis sous forme barytique et traité comme ci-dessus car il contenait lui aussi du manganèse.

En théorie, la proportion serait de 5,7 % pour un nucléotide barytique mono-phosphate, et de 9,2 % pour un di-phosphate.

Nous avons donc un di-phospho-nucléotide.

4. Le sulfate.

Les sulfates sont particulièrement labiles en milieu acide : quelques minutes de chauffage suffisent pour en détacher une quantité notable; d'où les précautions qu'il faut prendre lors de la purification.

Le dosage est gêné par la présence simultanée du phosphore et du manganèse. Il doit être conduit différemment suivant que le nucléotide est baryté ou non.

La poudre barytée (63 mg) est traitée par HClO_4 12 N (0,8 ml; 105° ; 2 heures). On ajoute 50 ml d'eau et fait flocculer par le BaCl_2 . Le flocculat, très brun, contenant du Mn et du P, est reris 2 fois par HCl 12 N et chaque fois évaporé à sec, afin de solubiliser le plus possible de Mn sous forme MnCl_2 . Une fusion alcaline dans $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{K}_2\text{CO}_3$ met le reste du Mn et le Ba à l'état d'oxydes insolubles. Les ions SO_4^{2-} et PO_4^{3-} libérés viennent dans l'eau bouillante, légèrement chlorhydrique. Sur une fraction aliquote on dose les sulfates (à pH 1), sur une autre le phosphore.

On a trouvé 9,7 mg en SO_4 (23,5 mg de BaSO_4 bien blanc désormais) soit 16 % du poids du nucléotide baryté (théorie : 14,2 %, calculé en comptant 1 Mn et 1 Ba par molécule) et 5,7 mg en P, ce qui donnait un rapport P/ SO_4 égal à 2.

Le nucléotide non barytique élué du Bio-Gel (3,25 mg) est minéralisé par HNO_3 (2 ml) + HClO_4 (0,1 ml) pendant 9 heures. Les complexes pyrophosphoriques sont décomposés par ébullition dans l'eau (10 ml, 2 heures) et les sulfates dosés par néphélométrie suivant la méthode indiquée précédemment (I, A, 2).

Dans cette fraction, qui contenait 356 μg de P, on a trouvé 565 μg de SO_4 . Compte tenu de la légère erreur par excès qu'introduit la co-précipitation d'un peu de MnO_4 , isomorphe des SO_4 , on a donc ici encore 1 SO_4 pour 2 P.

5. Le manganèse.

Fort gênant dans les dosages de P et de SO_4 , sa présence est certaine, et nous l'avons reconnu par toutes les réactions colorées qu'il a données, caractéristiques, suivant ses degrés d'oxydation.

Il est probable qu'il est lié d'une façon fonctionnelle au nucléotide, mais la quantité de ce catalyseur n'a pu être évaluée avec précision car le baryum avait certainement déplacé une partie du manganèse, notamment durant les purifications.

C. — DISCUSSION.

Il résulte de ces différentes analyses qu'à partir de thalles de *Pelvetia canaliculata* nécrosés, il diffuse très rapidement dans l'eau salée un nucléotide contenant du manganèse et dont la composition : cytosine, ribose, phosphore, sulfate est dans le rapport molaire 1/1/2/1.

C'est la cytidine diphospho-sulfate (CDPS) homologue du PAPS (adénosine diphospho-sulfate) mis en évidence chez les végétaux supérieurs : coenzyme activateur et donneur de sulfates (LIPMAN, 1958; SCHIFF *et al.*, 1973). Le CDPS joue vraisemblablement un rôle analogue dans les thalles de *Pelvetia*.

Sa quantité relativement importante (nous en avons recueilli environ 200 mg en une seule extraction, à partir de 50 g sec de *Pelvetia*) laisse penser que ce CDPS intervient directement dans la fixation des sulfates sur la fucoïdine, car on ne connaît qu'à l'état de traces, dans les thalles, des substances soufrées autres : cystéine, méthionine (COULSON, 1953).

Ce nucléotide original représente semble-t-il le complément indispensable au fonctionnement de la fucoïdine, et on peut supposer à ce titre qu'il existe aussi dans les autres Algues brunes.

Cet activateur pourrait être spécifique des mucilages des Algues brunes car, d'après LINDBERG (1955), ce serait la choline-sulfate qui interviendrait dans la sulfatation des mucilages sulfurylés des Rhodophycées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le fucoïdane sulfurylé présent dans les parois de *Pelvetia canaliculata*, où il abonde, a des propriétés d'échange assez insolites.

Il se distingue par une affinité exceptionnelle vis-à-vis du magnésium, qui paraît se fixer sur les $-O-SO_3^-$ par une seule valence, dans un complexe hexacoordiné incluant de l'eau. Un cortège de molécules d'eau supplémentaires peut facilement s'agglutiner grâce aux charges résiduelles qui apparaissent. L'avidité du fucoïdane pour l'eau, son gonflement, comme aussi la facilité de sa dessiccation sous l'action d'un courant d'air, s'expliquent ainsi aisément.

L'ordre d'affinité du fucoïdane pour les cations de la mer est :



Le calcium est en quantités faibles. Il forme des ponts ioniques entre quelques radicaux sulfuriques rapprochés appartenant à la même chaîne glucidique ou à des chaînes voisines. Il doit être aussi, pour une bonne part, complexé sur les nombreux oxygènes qui tapissent l'intérieur des spires du fucoïdane.

A l'équilibre, dans un fucoïdane purifié plongé dans l'eau de mer, le sodium est aussi abondant que le calcium, bien que l'affinité soit plus faible, à cause de son abondance relative dans le milieu.

Dans les algues vivantes, un mécanisme enzymatique vient se superposer au mécanisme physico-chimique de l'échange et le gouverne : les ions sulfates sans doute saturés par le sodium sont constamment excrétés, avec une grande intensité, tandis qu'à la même vitesse des ions sulfates activés dans la coenzyme cytidine-diphospho-sulfate sont fixés par une sulfatase sur les $-OH$ libres du fucose. L'intrusion d'ions Na^+ serait ainsi constamment contrôlée et limitée par l'enzyme.

Le fucoïdane sulfurylé aurait donc un rôle de pré-sélection qui ramènerait les concentrations du sodium dans les limites acceptables pour le bon fonctionnement des mécanismes qui s'exercent au niveau de la membrane plasmique (EPSTEIN et ses successeurs, in RAINS, 1972).

L'hypothèse, généralement avancée par les écologistes, du rôle bénéfique de la fucoïdine dans l'adaptation des Algues brunes à la double agression de l'excès de salure de la mer et de la dessiccation atmosphérique paraît largement justifiée.

REMERCIEMENTS

Nous sommes heureux de remercier le Laboratoire Maritime du Museum, à Dinard, pour l'accueil et les facilités qu'il nous a constamment offerts, ainsi que M^{lle} Christine DENIS, Chimiste adjointe, pour sa compétence et l'aide patiente et très dévouée qu'elle nous a accordée.

BIBLIOGRAPHIE

- BECK M.T., 1970. — *Chemistry of complex equilibria*. R.A. Chalmers éd., Van Nostrand Reinhold Company, London, p. 165-166.
- BIDWELL R.G.S. & CRAIGIE J.S., 1963. — A note on the greatly reduced ability of *Fucus vesiculosus* to absorb or evolve CO₂ when not submerged. *Can. J. Bot.*, **41**, 179-182.
- BIDWELL R.G.S. & GHOSH N.R., 1963. — Photosynthesis and metabolism in marine algae. VI. The uptake and incorporation of S³⁵-sulfate in *Fucus vesiculosus*. *Can. J. Bot.*, **41**, 209-220.
- CHARLOT G. & BÉZIER D., 1949. — *Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale*. Masson éd., Paris, p. 536.
- COULSON C.B., 1953. — Amino acids of marine algae. *Chem. and Ind.*, **11**, 971-972.
- DELSAL J.L. & MANHOURI H., 1955. — Dosage du phosphore minéral par la méthode de Fiske et Subbarow modifiée. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37**, 1041-1054.
- EVANS L.V., SIMPSON M. & CALLOW M.E., 1973. — Sulphated Polysaccharide Synthesis in Brown Algae. *Planta (Berl.)* **110**, 237-252.
- GOUDOT A. & BERTRAND D., 1968. — *Les oligoéléments*. PUF éd., Paris, p. 41 et pp. 50-53.
- HAUG A., 1959. — Ion exchange properties of alginates fractions. *Acta chem. scand.*, **13**, 1250-1251.
- IVANOFF A., 1972. — *Introduction à l'Océanographie; propriétés physiques et chimiques des eaux de mer*. Vuibert éd., Paris, **I**, p. 18-19.
- DE LESTANG G., 1974. — Le fucoïdane sulfurylé de *Pelvetia canaliculata* (Dcne & Thur.). Etude physico-chimique et physiologique d'un facteur d'adaptation écologique. *Thèse Doct. (Etat), Sci. nat.*, Orsay et Centre Doc. C.N.R.S., n° A.O., 97.32.
- DE LESTANG-LAISNE G. & QUILLET M., 1972. — Sur la fucoïdine des Algues brunes. I. Corrélation entre la teneur en fucoïdine et l'aptitude à l'exondation. *Bull. Lab. mar. Dinard, N.S.*, **I**, 217-224.
- DE LESTANG G. & QUILLET M., 1973a. — Renouvellement rapide des esters sulfuriques de la fucoïdine des frondes intactes de *Pelvetia canaliculata* (Dcne & Thur.) pendant leur immersion en mer. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **277**, série D, 2005-2007.
- DE LESTANG G. & QUILLET M., 1973b. — Un nouveau nucléotide : le cytosine-ribose-diphospho-sulfate, isolé et caractérisé chez *Pelvetia canaliculata* (Dcne & Thur.). *C.R. Acad. Sci.*, Paris, **277**, série D, 2165-2167.
- LINDBERG B., 1955. — Methylated taurines and choline sulfate in Red Algae. *Acta chem. scand.*, **9**, 1323-1326.

- LIPMANN F., 1958. — Biological sulfate activation and transfer. *Science*, **128**, 575-580.
- MARSHAK A. & VOGEL H., 1951. — Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials. *J. biol. Chem.*, **189**, 597-605.
- MASSART L. & HOSTE J., 1947. — Dosage photométrique des nucléosides. *Biochim. biophys. Acta*, **I**, 83-86.
- MICHEL A. & BENARD J., 1964. — *Chimie minérale*, Masson éd., Paris, p. 41-43 et 251.
- MONGAR I.L. & WASSERMANN A., 1952. — Absorption of electrolyte by alginate gels without and with cation exchange. *J. chem. Soc. (London)*, 492-497.
- MONTREUIL J., 1952. — Etude sur les acides pentose-nucléiques. *Thèse Doct. (Etat) Sci. nat.*, Lille, n° 81, p. 20.
- RAINS D.W., 1972. — Salt transport by plants in relation to salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 367-388.
- REES D.A., 1972. — Shapely polysaccharides. *Biochem. J.*, **126**, 257-273. (The eighth Colworth Medal Lecture).
- SCHIFF J.A. & HODSON R.C., 1973. — The metabolism of sulfate. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 381-414.
- SCHMITT M., 1961. — Les Carraghenanes. *Chimie et physico-chimie des principes immédiats tirés des Algues*. Coll. Intern. du C.N.R.S., n° 103. Dinard, 1960. C.N.R.S. éd., Paris, p. 203.
- TRÉMILLON B., 1965. — *Les séparations par les résines échangeuses d'ions*. Gauthier-Villars éd., Paris, p. 22-38.
- WHISTLER R.L. & WOLFROM M.L., 1962. — *Methods in carbohydrate chemistry*. Acad. Press, New York, **I**, 389-390.

